

PCT/JP01/06660

20.08.01

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

REC'D 31 AUG 2001

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2000年 8月 3日

出 願 番 号

Application Number:

特願2000-236140

出 願 人

Applicant(s):

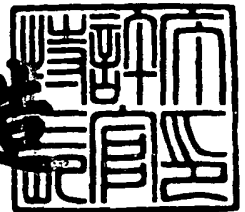
株式会社エス・ディー・エス バイオテック

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2001年 7月27日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2001-3066072

【書類名】 特許願

【整理番号】 BOP3424

【提出日】 平成12年 8月 3日

【あて先】 特許庁長官 及川 耕造 殿

【国際特許分類】 A01N 63/00

【発明者】

【住所又は居所】 札幌市北区北9条西9丁目 北海道大学大学院農学研究  
科内

【氏名】 浅野 眞一郎

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市緑ヶ原2丁目1番 株式会社エス・ディ  
ー・エス バイオテック つくば研究所内

【氏名】 山中 聡

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市緑ヶ原2丁目1番 株式会社エス・ディ  
ー・エス バイオテック つくば研究所内

【氏名】 武内 克義

【特許出願人】

【識別番号】 000127879

【住所又は居所】 東京都港区芝2丁目5番6号

【氏名又は名称】 株式会社エス・ディー・エス バイオテック

【代表者】 田代 実

【代理人】

【識別番号】 100081086

【住所又は居所】 東京都中央区日本橋人形町2丁目2番6号 堀口第2ビ  
ル7階 大家特許事務所

【弁理士】

【氏名又は名称】 大家 邦久

【電話番号】 03(3669)7714

【代理人】

【識別番号】 100088719

【住所又は居所】 東京都中央区日本橋人形町2丁目2番6号 堀口第2ビル7階 大家特許事務所

【弁理士】

【氏名又は名称】 千葉 博史

【電話番号】 03(3669)7714

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 043731

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9712845

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 殺虫活性を有する蛋白質、その蛋白質をコードするDNA、有害生物防除剤及び防除方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1に示すアミノ酸配列を有し、殺虫活性を示す結晶性蛋白質。

【請求項2】 配列番号1に示すアミノ酸配列の複数のアミノ酸が付加、欠失または置換された配列を有し、殺虫活性を示す蛋白質。

【請求項3】 請求項1記載の蛋白質をコードする塩基配列を含むDNA。

【請求項4】 配列番号3に示す塩基配列を含む請求項3に記載のDNA。

【請求項5】 請求項2に記載の蛋白質をコードする塩基配列を含むDNA

。

【請求項6】 配列番号1に示すアミノ酸配列を有する蛋白質を生産する、(1-1) バチルス・チューリンゲンシス・セロバー・ガレリア (Bacillus thuringiensis serovar galleriae) SDS502株、(1-2) その変異株、(1-3) 配列番号1に示すアミノ酸配列を有する蛋白質をコードする塩基配列を含むDNAで形質転換された微生物を含むか、または(2-1) 前記SDS502株、(2-2) その変異株または(2-3) 形質転換された微生物が生産する殺虫活性を有する蛋白質を含むことを特徴とする有害生物防除剤。

【請求項7】 請求項5に記載のDNAを用いて形質転換され請求項2に記載の殺虫活性を示す蛋白質を生産する微生物。

【請求項8】 請求項3または請求項5に記載のDNAを用いて形質転換された植物またはその種子。

【請求項9】 請求項1または2記載の蛋白質を有害生物に摂食させることにより、その有害生物により引き起こされる被害から植物を保護する有害生物防除方法。

【請求項10】 請求項9記載の有害生物が鞘翅目害虫であり、その害虫により引き起こされる被害から植物を保護する有害生物防除方法。

【請求項11】 配列番号1に示すアミノ酸配列を有し殺虫活性を示す蛋白

質を生産するバチルス・チューリングエンシス・セロバー・ガレリア (Bacillus thuringiensis serovar galleriae) S D S 5 0 2 株。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】

本発明は、殺虫活性を有する蛋白質、その蛋白質をコードするDNA、有害生物防除剤及び防除方法、並びに新規なバチルス・チューリングエンシス・セロバー・ガレリア S D S 5 0 2 (Bacillus thuringiensis serovar galleriae SDS502、以下 S D S 5 0 2 と略記することがある。) 株に関する。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】

バチルス・チューリングエンシス (Bacillus thuringiensis、以下 B t と略記することがある。) は、他の Bacillus 属細菌と同様に内生孢子を形成する。この孢子は適当な栄養成分の存在のもとで、発芽し、栄養細胞へと成長する。栄養細胞は、次々に細胞分裂を繰り返し、やがて栄養成分の枯渇や環境の変化などにより、細胞内で内生孢子と結晶蛋白質 (Crystal protein) を形成する孢子嚢に変化する。更に細胞は崩壊して内生孢子と結晶蛋白質は菌体外に遊離する。

【 0 0 0 3 】

B t の産生するこの芽胞及び結晶蛋白質を昆虫が摂食し、消化管の中腸に到達した時、この蛋白質は消化液の強アルカリ条件下で、溶解してプロトキシンとなり、ついで蛋白質分解酵素により活性成分 (トキシン) に変化する。この活性成分は中腸上皮細胞の受容体に結合し、その付近の細胞を損傷させる。そして損傷した部分において消化液と体液が混ざり合い、体内の浸透性や pH が変化する。その結果、昆虫の食物消化機能が乱れ、口器の麻痺を引き起こし、摂食活動が低下する。さらに、芽胞が栄養条件下で発芽し、栄養細胞が増殖すると共に昆虫の血体腔内に侵入し、敗血症を引き起こす。

【 0 0 0 4 】

昆虫種によって感受性は異なるが、通常 B t を摂食して数時間で摂食活動は停止し、2～3日後には死亡する。B t 処理後に生存虫がいても食害が少ないのは

この現象による。多くの合成殺虫剤は、昆虫の神経系に作用するため、激しいけいれんやノックダウン効果、麻痺などの現象が見られるが、B t の作用機作は上記のように全く異なり、処理後に生存虫がいても徐々に効果が発現されてくる。このB t 並びにB t の産生する殺虫活性を示す蛋白質（結晶性毒素蛋白質）は、環境を汚染しない微生物農薬（B t 剤）として、特に鱗翅目害虫に対する殺虫剤として非常に有用であり、実際に世界各国で使用されている。

## 【 0 0 0 5 】

B t は、グラム陽性の桿状菌で対数増殖末期の孢子形成期に結晶蛋白質を産生する。この結晶蛋白質は、昆虫が経口的に消化管内に取り入れたとき、消化液中でアルカリ分解、酵素分解を受けてはじめて腸管麻痺並びに全身麻痺を伴う殺虫活性を示す蛋白質となるが、哺乳類に対しては毒性を示さない。

B t の産生する結晶蛋白質は、芽胞嚢内で、芽胞とならんで形成され、芽胞嚢の時期を経て芽胞とともに菌体外に遊離する（Nature, 172, 1004, 1953）。これらは、一般にダイヤモンド型（diamond-shaped）、重ピラミッド型（bipyramidal）、偏菱型立方体（rhomboidal）等の複雑な結晶体を構成しており、水に不溶性である。孢子形成時に通常1個ずつ産生され菌体の崩壊に伴って孢子とともに培地中に放出される。通常立体的な菱形や斜方晶形構造をしており、長辺 $2.0\mu$ 、短辺 $0.6\mu$ 程度の大きさであるが、亜種の場合は不定形のものなどあり、大きさも形状も様々である。また表面には規則性の縞構造が見られる。培地からの結晶蛋白質の分離及び精製は、二層分画法または密度勾配遠心法などで行なわれる。

## 【 0 0 0 6 】

結晶蛋白質は、pH 12以上のNaOH溶液に可溶であり、SDS-PAGE（ポリアクリルアミドゲル電気泳動）による分析により、バチルスチューリンゲンシス（Bacillus thuringiensis）に属する菌株では130～135kDa前後、65kDa前後及び80kDa前後の3つの蛋白質が認められる。これらは、Cry 1 蛋白、Cry 2 蛋白、Cry 5 蛋白と総称されている。更にこれらは液体高速クロマトグラフィーなどの分画操作によりほぼ近似する分子量ではあるが部分的に異なる複数の蛋白質に分離できる。すなわち、Cry-1 蛋白の場合は、さらにCry-1Aa、Cry 1Ab等の蛋白質に分類される。

## 【0007】

Bt は、1911年ドイツ人研究者ベルリナー (Berliner) により、スジコナマダラメイガ幼虫から分離された。この幼虫がチューリングシア地方から来た粉を食害したために、チューリングシス (Thuringensis) と命名された。また、それより古く1901年石渡博士が同一菌種をカイコの病原性細菌として分離しており、古くから全世界規模で自然界で存在していることが分かる。例えば、貯穀害虫が生息する貯穀倉庫、製粉所などに存在し、また穀物を輸送する貨車や船室等からも検出され、世界の至る所に移動していることも分かっている。日本においても各地における分布が調べられ、養蚕農家の塵埃中、植物体上等から多くのバチルス・チューリングシス (Bacillus thuringiensis) が分離されている。

## 【0008】

バチルス (Bacillus) 属に含まれる細菌は70種以上に及ぶが、全世界的に自然界で頻繁に認められるのは、22種である。チエリイ及びフランソン (Thiery and Frachon) の手法により、これらは基本的に孢子形成能及び孢子の形状、糖からのガスの産生、アセチルメチルカルビノール (AMC) の産生、硝酸塩の還元、いくつかの糖の資化性によって区別され、バチルス・チューリングシス (B. thuringiensis) は最終的に殺虫活性を有する結晶蛋白質の有無により近縁種と区別することができる (「Manual of techniques in insect pathology」 L. Lacey ed. Academic press, California, 55-77. (1997))。

バチルス・チューリングシス (Bacillus thuringiensis) と他の細菌種及びバチルス (Bacillus) 属に含まれる他の菌種との区別に用いられる特徴は、グラム陽性桿菌、カタラーゼ (+)、孢子形成 (+) 卵形孢子、栄養細胞の幅  $0.9\mu$  以上、アセチルメチルカルビノールの産生 (+)、通性嫌気性、D-マンニトールの資化 (-)、結晶蛋白質の存在 (+) である。

## 【0009】

Bt の亜種の同定には、40年もの間、細菌の鞭毛に対するウサギの血清中の抗体を用いるドウ バルジャ及びボンフォア (De Barjac and Bonefoi) らの血清学的手法による鞭毛抗原 (H-antigen) が用いられている (Entomophaga 7,5-31,1962)。これは、バチルス・チューリングシス (B. thuringiensis) の系統

分類に対し、広く利用されている手法である。

これら菌株の殺虫活性は亜種によって異なっており、極めて特異性の高いものとなっている。例えば、鱗翅目昆虫に活性を示す亜種としてクルスタキ (kurustaki)、アイザワイ (aizawai) 等が、又鞘翅目昆虫に活性を示す亜種としてテネブリオニス (tenebrionis)、ヤポネンシス (japonensis) 等が知られている。

#### 【0010】

しかし、実際には同じ亜種でも菌株ごとに殺虫活性スペクトラムは異なっており、一部の鱗翅目害虫に活性を示す B t 株では害虫の抵抗性が生じている。また、鞘翅目昆虫に有効な活性を示す菌株の報告は非常に少ない。

このように B t 剤に抵抗性の生じた鱗翅目害虫に対しても効果のある新規な B t 剤が求められている。更に、鞘翅目昆虫に対して活性を有する B t 剤に対する需要も高い。この中で、鞘翅目昆虫の幼虫特にコガネムシ幼虫に対して殺虫活性を有する新規 B t 剤はこれまでのところバシルス・チューリンゲンシス・セロバー・ジャポネンシス・ストレイン・ブイブイ (Bacillus thuringiensis Serovar . japonensis strain buibui) 株 (特開平 6-65292、特開平 7-179) 及びバシルス・チューリンゲンシス・バー・ジャポネンシス N141 (Bacillus thuringiensis var. japonensis N141) (特開平 8-228783) 株が報告されているに過ぎない。

#### 【0011】

##### 【発明が解決しようとする課題】

コガネムシ類幼虫であり、特にシバ、サトイモ、サツマイモ、ラッカセイ等の大害虫であるドウガネブイブイの幼虫やシバ草害虫であるセマダラコガネ、マメコガネなどの害虫に対し、従来の亜種ヤポネンシスに属するブイブイ株あるいは N141 株は十分な効果を示していない。さらに、同様の昆虫種に対して同じ菌種 (亜種) に属する B t トキシンは、一部において抵抗性が発達すると、交差性を示し、その効果は著しく低下する。一方、これらの B t トキシンも効果発現には時間を要し、より強力な殺虫活性を有する新規トキシンの発見が熱望されている。

#### 【0012】



従って、本発明の課題は、鞘翅目昆虫幼虫に対し高い殺虫活性を示す殺虫性蛋白質を産生する新規なバチルス・チューリンゲンシス・セロバー・ガレリア (Bacillus thuringiensis serovar galleriae) に属する新菌種を提供し、その新規微生物に由来する殺虫活性を有する蛋白質を提供することにある。

さらに本発明の課題は、前記殺虫活性を有する蛋白質、その蛋白質を構成するアミノ酸配列の複数のアミノ酸が付加、欠失または置換された配列を有し同様の殺虫活性を示す蛋白質、それらアミノ酸配列をコードするDNA、それらのDNAを用いて形質転換され殺虫活性を示す蛋白質を生産する微生物、それらのDNAを用いて形質転換された植物またはその種子、並びに有害生物防除剤及び防除方法を提供することにある。

#### 【 0 0 1 3 】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、鞘翅目昆虫の幼虫に高い効果を示す新規微生物を検出すべく、多くの土壌について分析を重ね、バチルス・チューリンゲンシス・セロバー・ガレリア (Bacillus thuringiensis serovar galleriae) に属し、鞘翅目幼虫に対する高い殺虫性毒素蛋白質を産生する能力を有する新規微生物バチルス・チューリンゲンシス・セロバー・ガレリア (Bacillus thuringiensis serovar galleriae) SDS 502 株を見出し、この新規なバチルス・チューリンゲンシス・セロバー・ガレリア SDS 502 (Bacillus thuringiensis serovar galleriae SDS 502) 自身及び／またはそれが産生する殺虫性蛋白質（毒素蛋白質）を有効成分として含有する殺虫剤に係る本発明に到達した。

また、本発明の新規微生物が産生する殺虫性蛋白質をコードしているDNA、そのDNAにコードされたアミノ酸配列を有する蛋白質及びその蛋白質を有効成分として含有する有害生物防除剤が害虫防除手段として有効であることを確認し、本発明を完成するに至った。

#### 【 0 0 1 4 】

すなわち、本発明は以下の(1) 殺虫活性を示す蛋白質、(2) それらの蛋白質をコードするDNA、(3) 有害生物防除剤及び(4) 植物保護方法、(5) 前記DNAを用いて形質転換された(5-1) 微生物、(5-2) 植物またはその種子、並びに(6)

新規微生物に関する。

- 1) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列を有し、殺虫活性を示す蛋白質。
- 2) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列の複数のアミノ酸が付加、欠失または置換された配列を有し、殺虫活性を示す蛋白質。
- 3) 前記 1 記載の蛋白質をコードする塩基配列を含む DNA。
- 4) 配列番号 2 に示す塩基配列を含む前記 3 に記載の DNA。
- 5) 前記 2 に記載の蛋白質をコードする塩基配列を含む DNA。
- 6) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列を有する蛋白質を生産する、(1-1) バチルス・チューリンゲンシス・セロバー・ガレリア (Bacillus thuringiensis serovar galleriae) S D S 5 0 2 株、(1-2) その変異株、(1-3) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列を有する蛋白質をコードする塩基配列を含む DNA で形質転換された微生物を含むか、または(2-1) 前記 S D S 5 0 2 株、(2-2) その変異株または(2-3) 形質転換された微生物が生産する殺虫活性を有する蛋白質を含むことを特徴とする有害生物防除剤。7) 前記 5 に記載の DNA を用いて形質転換され前記 2 に記載の殺虫活性を示す蛋白質を生産する微生物。
- 8) 前記 3 または前記 5 に記載の DNA を用いて形質転換された植物またはその種子。
- 9) 前記 1 または 2 記載の蛋白質を有害生物に摂食させることにより、その有害生物により引き起こされる被害から植物を保護する有害生物防除方法。
- 10) 前記 9 記載の有害生物が鞘翅目害虫であり、その害虫により引き起こされる被害から植物を保護する有害生物防除方法。
- 11) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列を有し殺虫活性を示す蛋白質を生産するバチルス・チューリンゲンシス・セロバー・ガレリア (Bacillus thuringiensis serovar galleriae) S D S 5 0 2 株。

【 0 0 1 5 】

本発明の新規なバチルス・チューリンゲンシス・セロバー・ガレリア (Bacillus thuringiensis serovar galleriae) S D S 5 0 2 は、通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所に受託番号 F E R M P - 17979 として寄託されている。

S D S 5 0 2 株は、一般細菌の生育可能な培地を用い、通常の発酵手法を用い

て培養が可能である。

培地としては、普通ブイヨン培地（肉エキス 0.3%、ペプトン 1.0%、NaCl 0.5%、pH 7.0）、MBS培地（ $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.7%、バクトトリプトース 1%、酵母エキス 0.2%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.03%、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.02%、pH 7.2）、MRVP培地（ポリペプトン 0.5%、グルコース 0.5%、NaCl 0.5%、pH 7.0）などが挙げられる。

#### 【0016】

炭素源としては、グルコース、フラクトース、サッカロース、マルトース、糖蜜、可溶性デンプン、コーンスターチなどが利用できる。

窒素源としては、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、尿素、酵母エキス、ペプトン、大豆粉、カゼインなどが利用できる。

さらに、その他の無機塩類、ビタミンなどとして、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{MnSO}_4$ 、 $\text{FeSO}_4$ 、 $\text{MgSO}_4$ 、NaCl、糖蜜、酵母エキス、エビオス（ビタミン剤）などを添加することが好ましい。pHは6～8が好ましく、培養温度は25～33℃が好ましく、培養時間は24～120時間が好ましい。培養方法は、通気攪拌培養等の好氣的条件によるものが好ましい。

#### 【0017】

培養後、培養液から殺虫性結晶蛋白質を分離する場合、通常の遠心分離法、濾過法等が利用できる。また、SDS502株及び／またはSDS502株が産生する結晶蛋白質を、栄養細胞及び／または孢子から分離せず、混在した形で使用することもできる。

#### 【0018】

また、上記SDS502株を元菌株として自然または誘発突然変異により、上記菌株と同様に殺虫性結晶蛋白質を生産する変異株を得て、本発明による殺虫性結晶蛋白質生産菌として用いることができる。これらの変異株を調整する方法としては、従来知られている慣用の方法、例えば元菌株を紫外線照射あるいはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン（NTG）等の薬剤による人工突然変異処理を施して、スキムミルク等を含む寒天培地に広げ、生育してくる菌株の中からコロニーのまわりに形成されるクリアゾーンがより大きいコロニーを

選抜し、生産性の優れた菌株を選別する方法を用いることができる。

【0019】

SDS502株及び／またはSDS502結晶蛋白質を有効成分とした有害生物防除剤を作成する場合、一般農薬と同様に水和剤、粒剤、粉剤、フロアブル剤などの任意な剤型として作成することができる。これらは、それぞれの剤型にふさわしい担体、例えば、ロウ石、タルク、カオリン、炭酸カルシウム、ベントナイト、珪石粉、石灰石粉末、酸性白土、珪藻土類粉末、石膏、軽石粉末、貝殻類粉末、雲母粉末、コロイド性含水珪酸ソーダなどの鉱物質粉末、水、緩衝液などの水溶液と混用して用いられ、好ましくは、アルキルベンゼンスルホネート、アルキルスルホネート等の固着剤、ポリオキシエチレン（POE）アルキルエーテル、POEアルキルフェニルエーテル、POEジアルキルフェニルエーテル、POEアルキルアミン、ジアルキルスルホサクシネート等の湿潤剤、アルキルサルフェート、POEアルキルエーテルサルフェート、POEアルキルフェニルエーテルサルフェート、POEベンジル化（あるいはサルチル化）フェニル（またはフェニルフェニル）エーテルサルフェート、パラフィン（アルカン）スルホネート、アルファオレフィンスルホネート（AOS）、アルキルベンゼンスルホネート、モノまたはジアルキルナフタレンスルホネート、ナフタレンスルホネート・ホルマリン縮合物、アルキルジフェニルエーテルジスルホネート、リグニンスルホネート、POEアルキルエーテルスルホコハク酸ハーフエステル、POEベンジル（あるいはスチリル化）フェニル（またはフェニルフェニル）エーテルフォスフェート等の分散剤、パラオキシ安息香酸誘導体、サリチルアニライド、1，2-ベンズイソチアゾリン-3-オン、テトラフタロニトリル（TPN）、2-ニトロブromo等の防黴剤を添加して用いられる。

【0020】

また、SDS502株及び／またはSDS502株産生結晶蛋白質を単一の有効成分とするのではなく、他の有害生物に有効な除草剤、各種殺虫剤、殺菌剤、植物生長調節剤または効果を助長させる共力剤、誘引剤さらには他の効用を目的とする植物栄養剤、肥料等を混合することも可能である。

SDS502株及び／またはSDS502株産生結晶蛋白質を有効成分とした

有害生物防除剤の作成に当たりその有効成分含有量は、10～99%、好ましくは40～90%程度が適当であるが、対象有害生物、栽培作物、使用方法、使用時期等に応じて、有効成分含有量は調整される。

## 【0021】

また本発明の結晶性蛋白質としては、配列番号1で示されたアミノ酸を有するもの以外に、その一部が欠損したもの（例えば、配列番号1の配列中、生物活性の発現に必要な部分だけからなるポリペプチド等）、その一部が他のアミノ酸と置換したもの（例えば、物性の類似したアミノ酸に置換したもの）、およびその一部に他のアミノ酸が付加または挿入されたものも含まれる。

よく知られているように、ひとつのアミノ酸をコードするコドンは1～6種類（例えば、Metは1種類、Leuは6種類）知られている。従って、ポリペプチドのアミノ酸配列を変えることなくDNAの塩基配列を変えることができる。

## 【0022】

本発明の方法で防除し得る害虫としては以下の鞘翅目 (Coleoptera) 害虫が挙げられる。すなわち、ドウガネブイブイ (Anomala cuprea)、ウスチャコガネ (Anomala diversa)、ヒラタアオコガネ (Anomala octiescostata)、アシナガコガネ (Hoplia communis)、ヒメアシナガコガネ (Ectinohoplia obducta)、セマダラコガネ (Anomala orientalis)、オオサカスジコガネ (Anomala osakana)、スジコガネ (Anomala testaceipes)、チビサクラコガネ (Anomala schonfeldti)、ヒメコガネ (Anomala rufocuprea)、アオドウガネ (Anomala albopilosa)、アカビロウドコガネ (Maladera castanea)、コフキコガネ (Melolontha japonica)、コイチャコガネ (Adoretus tenuimaculatus)、マメコガネ (Popillia japonica) 等のコガネムシ類、ニジュウヤホシテントウ (Epilachna vigintioctopunctata)、オオニジュウヤホシテントウ (Epilachna vigintioctomaculata) 等のテントウムシ類、イネミズゾウムシ (Lissorhoptrus oryzophilus)、サビヒョウタンゾウムシ (Scepticus griseus)、アリモドキゾウムシ (Cylas formicarius)、シバオサゾウムシ (Sphenophrus venatus vestius)、コクゾウムシ (Sitophilus zeamais) 等のゾウムシ類、キスジノミハムシ (Phyllotreta striolata)、ウリハムシ (Aulacophora femoralis) 等のハムシ類、オキナワ

カンシャクシコメツキ (Melanotus okinawaensis) 等のコメツキムシ類、マツノマダラカミキリ (Monochamus alternatus)、ゴマフカミキリ (Mesosa myops) 等のカミキリムシ類、ニホンキクイムシ (Scolytus japonicus)、ハンノキキクイムシ (Xylosandrus germanus) 等のキクイムシ類、及びチャイロコメノゴミムシダマシ (Tenebrio molitor)、コクヌストモドキ (Tribolium castaneum) 等のゴミムシダマシ類である。

## 【 0 0 2 3 】

SDS 5 0 2 株及び／または SDS 5 0 2 株産生結晶蛋白質を有効成分とした有害生物防除剤を用いる本発明の有害生物防除方法は、鞘翅目害虫が加害する広範囲の植物を保護するために使用することができる。対象となる植物の具体例としては、ハクサイ、カンラン等に代表される野菜類、カリフラワー等の果菜類、サツマイモ、里芋等の根菜類、柑橘、落葉果樹、イネ、小麦、豆類等の穀類、ゴルフ場、庭園等における芝生、茶、サトウキビ等の特用作物、貯穀、貯蔵食品及び花樹である。また、植林地及び公園等の非農耕地の樹木等や森林の樹木及び苗木等にも使用可能である。

一般に SDS 5 0 2 株及び／または SDS 5 0 2 株産生結晶蛋白質を有効成分とした有害生物防除剤を用いて鞘翅目害虫による虫害から植物を保護する方法は、害虫が蔓延した植物または蔓延しそうな植物を、水等の希釈剤で希釈した上記の有害生物防除剤組成物で処理する（例えば散布する）ことにより、または希釈を行わず直接土壌に混和あるいは注入することにより実施される。

## 【 0 0 2 4 】

SDS 5 0 2 遺伝子は、SDS 5 0 2 株から単離することが可能である。1つまたはそれ以上の制限酵素を用いて SDS 5 0 2 株の全 DNA を消化し、産生された DNA 断片を 2 ～ 5 k b p の DNA 画分とする。このような画分を好適なベクターに連結し、これにより大腸菌を形質転換する。次に、SDS 5 0 2 株が産生する殺虫性結晶蛋白質に対する抗体を用いてエンザイムイムノアッセイ法を行い、目的遺伝子を保持した大腸菌形質転換体を得ることができる。

こうして得られた SDS 5 0 2 由来の結晶蛋白質遺伝子 DNA を、好適な制限酵素で処理し、得られた DNA 断片を好適なクローニングベクターに連結し、遺

伝子カセットを作製し、大腸菌や枯草菌などの微生物を形質転換することができる。例えば、大腸菌を形質転換し、ダイデオキシ法等の遺伝子解析法などにより、SDS502株産生結晶蛋白質をコードする塩基配列を解析することができる。

#### 【0025】

この遺伝子カセットを用いて殺虫活性を有するグラム陽性細菌、たとえばバチルス・チューリンゲンシス・セロバー・ガレリア (Bacillus thuringiensis serovar galleriae) や他の亜種を形質転換することもできる。それにより、より広範囲の昆虫を防除するのに有効な形質転換されたバチルス・チューリンゲンシス (Bacillus thuringiensis) を得ることができる。

さらに植物中でSDS502遺伝子を発現させるために、好適制限部位を導入し、各遺伝子または遺伝子部分の側面に位置させ、特定部位の突然変異誘発を行うこともできる。

そしてSDS502株の殺虫性結晶蛋白質の有効部分をコードするSDS502遺伝子部分は、単一な植物細胞の核ゲノム中に安定に挿入され、昆虫耐性あるいは殺昆虫性の能力を持つ形質転換植物を作ることができる。

#### 【0026】

その結果、得られた形質転換植物を用いて、同一の特徴を有する形質転換された植物を生産することができ、さらには同一または関連の植物種の他の変種に昆虫耐性あるいは殺昆虫性の能力を持つSDS502遺伝子部分を導入できる。形質転換植物から得られる種子は安定したゲノム挿入物であり、殺虫剤として有効な昆虫耐性あるいは殺昆虫性を発揮し得るSDS502遺伝子部分を含有する。

#### 【0027】

SDS502株はさらに、1つまたはそれ以上の殺虫活性を持った外来Bt遺伝子で形質転換することができる。例えば、SDS502株及び／またはSDS502株産生結晶蛋白質が活性を示さない他の有害生物として、特に鱗翅目幼虫が挙げられるが、これに対して有効な活性を示す他の微生物由来の結晶蛋白質をコードした遺伝子とのキメラ遺伝子を作成し、より殺虫スペクトラムの広い微生物へ形質転換させることもできる。これにより、より広範囲の害虫を駆除するこ

とができる形質転換 SDS 5 0 2 株が産生される。

また SDS 5 0 2 株結晶蛋白質を用いて、モルモットに対し免疫し、この結晶蛋白質に特異的な抗体を調製することができる。

【 0 0 2 8 】

【実施例】

以下、本発明を実施例に基づいて本発明を説明するが、本発明は下記の例に何等限定されるものではない。

【 0 0 2 9 】

実施例 1 : バシルス・チューリンゲンシス・セロバー・ガレリア (Bacillus thuringiensis serovar galleriae) SDS 5 0 2 株の単離

つくば市内で採取した土壌から以下の手法を用いてバシルス・チューリンゲンシス・セロバー・ガレリア (Bacillus thuringiensis serovar galleriae) SDS 5 0 2 株を単離した。

試料土壌 1 0 m g を三角フラスコに入れ 1 0 m L の滅菌水を注入し 3 0 分間振盪した後、暫時静置した。その上澄み液 2 m L をとり、直ちに 8 0 ° C で 1 0 分間加熱した。加熱液を 1 0 倍及び 1 0 0 倍に 2 段階希釈し、各々 1 m L の希釈液を NB 平板培地 (肉エキス 0 . 3 % , ペプトン 1 . 0 % , N a C l 0 . 5 % , 寒天 2 % , p H 7 . 0 / 蒸留水) 上で、2 4 ~ 4 8 時間 3 0 ° C で培養した。

得られたコロニーのうち、白色で、コロニーの縁がラフで、素早く成長しているものを選択することでバシルス・チューリンゲンシス (B. thuringiensis) が高い確率で得られた。

【 0 0 3 0 】

実施例 2 : バシルス・チューリンゲンシス・セロバー・ガレリア (Bacillus thuringiensis serovar galleriae) SDS 5 0 2 株の細菌学的性質

方法 : Cowan, S. T. 著 (坂崎利一訳、近代出版) 「医学細菌同定の手引き」に記載の分類学、細菌学的手法にしたがって調査を行った。

【 0 0 3 1 】

グラム染色性 : グラム陽性桿菌、

コロニーの形態 : 不規則縁を有する不透明ベージュ色のコロニーを形成、



孢子形成能およびその形状：（＋）卵形孢子、

カタラーゼ：（＋）、

栄養細胞の幅：0.9  $\mu$ 以上、

AMCの産生：（＋）、

呼吸：通性嫌気性、

D-マンニトールの資化：（－）、

結晶蛋白質の存在：（＋）、

鞭毛の血清型：H抗血清型（5 a 5 b）

細胞内含有物：孢子形成細胞は不定型結晶蛋白質を作る（図1参照）、

アルカリ可溶性蛋白：（＋）130 kDa付近に泳動される蛋白質（図2参照）

活性： 本菌株は供試した鞘翅目害虫に対し致死活性を有する。

以上の事実から、本菌株を新規菌株と判断し、これをバチルス・チューリンゲンシス・セロバー・ガレリア (Bacillus thuringiensis serovar galleriae) SDS502と命名し、通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所に受託番号FERM P-17979として寄託した。

#### 【0032】

実施例3：バチルス・チューリンゲンシス・セロバー・ガレリア (Bacillus thuringiensis serovar galleriae) SDS502の亜種の決定

鞭毛抗原に由来する抗体を用いたセロタイピングバチルス属菌の持つ鞭毛の蛋白に対する抗体を用いて、未知の菌の鞭毛タンパク質を抗原として抗原抗体反応を行った。

鞭毛H血清の調整は、菌体抗原は100℃で加熱して鞭毛を剥離し調整した。既に知られているバチルス・チューリンゲンシス (Bacillus thuringiensis) 40種類（亜種）のH抗原基準株を用い、クライギー (Craigie) 管（0.5%半流動寒天培地）を用いて運動性の良好な細菌を選択し、それを用いてホルマリン死菌を作製し、これを家兎に免疫した。H血清はそれぞれの抗血清から相応するバチルス・チューリンゲンシス (Bacillus thuringiensis) 菌体抗原に対する抗体を吸収して調整した。H抗原の血清型とH血清の凝集素価は、大庭，鮎沢の方

法 (I. Invertebr. Pathol., 32, 303-309, 1978) によって同定、定量した。

### 【0033】

バチルス・チューリングエンシス・セロバー・ガレリア (Bacillus thuringiensis serovar galleriae) SDS 502 株に対する H 血清は、セロバー・ガレリア (serovar galleriae) のみを特異的に凝集した。セロバー・ガレリア (serovar galleriae) SDS 502 株 H 血清の相応するホモの抗原に対する凝集素価は、12,800 倍であり、セロバー・ガレリア (serovar galleriae) HD 8 株 (基準株) に対する凝集素価は 6,400 倍であった。従って、SDS 502 株とセロバー・ガレリアは同一の菌種と判断される。

### 【0034】

実施例 4 : SDS 502 株結晶蛋白質の精製と特性

SDS 502 株を一白金耳とり、5 ml の普通ブイヨン培地 (肉エキス 0.3 %, ペプトン 1.0 %, NaCl 0.5 %, pH 7.0 / 蒸留水) を含んだ試験管に植菌し、30℃で24時間往復振盪培養を行い種培養液を得た。種培養液を終濃度 1 % となるように 100 mL の上記培地を含んだ 500 mL 容三角フラスコに植菌し、30℃で96時間、250 rpm で回転振盪培養を行った。次いで、細胞、孢子及び結晶蛋白質を遠心分離によって回収した。得られた沈殿に適当量の緩衝液 (Tris-HCl, NaCl, EDTA) を加え超音波破碎を行い、懸濁液を得た。得られた懸濁液を 8 % SDS-PAGE ゲル電気泳動にかけ泳動パターンを調べた。また、抗体を用いてウエスタンブロッティングもおこなった。その結果、SDS 502 株の産生する分子量約 130 kDa の結晶蛋白質が存在することが分かった。

### 【0035】

実施例 5 : SDS 502 株のドウガネブイブイ (Anomala cuprea)、マメコガネ (Popillia japonica)、セマダラコガネ (Anomala orientalis)、コナガ (Plutella xylostella)、カイコガ (Bombyx mori) に対する殺虫活性

実施例 4 で調製した懸濁液を結晶蛋白質濃度が 10  $\mu$ g/ml となるように希釈し、展着剤を添加して試料溶液とした。この試料溶液を予め滅菌処理しておいた腐葉土に混和し、ドウガネブイブイ (Anomala cuprea) 1 令、2 令、3 令幼虫

、マメコガネ(Popillia japonica) 1、2 令幼虫、セマダラコガ(Anomala orientalis) 1、2 令幼虫をそれぞれ放虫した。

また、この試料溶液中にキャベツの葉を浸し、その後これを十分に風乾し、湿った濾紙を入れたスチロールカップに入れた。この中に、3 齢中期のコナガ (Plutella xylostella) 幼虫を放虫し、7 日後 (カイコは 5 日後、コナガは 2 日後) の幼虫の死虫率を下記の計算式から求めた。なお、試験は 5 連 1 区 5 頭制で行った。

【数 1】

$$\text{死虫率 (\%)} = (\text{死虫数} / \text{放虫数}) \times 100$$

また、この試料溶液を人工飼料 5 g 中に混入し、シャーレに入れた。この中に、3 齢 2 日目のカイコガ (Bombyx mori) 幼虫を放虫し、7 日後 (カイコは 5 日後、コナガは 2 日後) の幼虫の死虫率を上記の計算式から求めた。なお、試験は 5 連 1 区 5 頭制で行った。対象としてバチルス・チューリンゲンシス・セロバー・ガレリア (Bacillus thuringiensis serovar galleriae) HD 8 株 (基準株) の生産する殺虫性蛋白の試料溶液を同様に作成して比較を行った。

【0036】

その結果、バチルス・チューリンゲンシス・セロバー・ガレリア (Bacillus thuringiensis serovar galleriae) SDS 502 の生産する結晶蛋白の殺虫スペクトル (表 1) に示したように、SDS 502 株の生産する殺虫性蛋白質は、鞘翅目昆虫のドウガネブイブイ (Anomala cuprea Hope)、セマダラコガネ (Anomala orientalis)、マメコガネ (Popillia japonica) に対して  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で殺虫効果を示したが、バチルス・チューリンゲンシス・セロバー・ガレリア HD 8 株 (基準株) の生産する殺虫性蛋白は殺虫活性を示さなかった。一方、HD 8 株 (基準株) は、鱗翅目昆虫のカイコ (Bombyx mori)、コナガ (Plutella xylostella) 及びハスモンヨトウ (Spodoptera litura) 幼虫に高い活性を示すが、SDS 502 株はコナガ以外の鱗翅目昆虫に対しては活性を示さなかった。これらの結果より、ガレリア基準株が *cry1Ab* 遺伝子をもち、鱗翅目に殺虫効果があるのに対し、SDS 502 株は鱗翅目に殺虫効果がほとんど無いことから、これらの結晶蛋白質が異なる組成を持っていることが示唆され、両株は全く

同一の菌株とは言えないことが明らかとなった。

【0037】

【表1】

結晶蛋白質 (10 $\mu$ g) を摂食させたとき7日後の死亡率 (%)		
昆虫名	<u>Bacillus thuringiensis serovar galleriae</u>	
	SDS502株	HD8株 (基準株)
ドウガネ幼虫 (1令幼虫)	100	0
ドウガネ幼虫 (2令幼虫)	100	0
ドウガネ幼虫 (3令幼虫)	80	0
マメコガネ (1令幼虫)	100	0
マメコガネ (2令幼虫)	100	0
セマダラコガネ (1令幼虫)	100	0
セマダラコガネ (2令幼虫)	100	0
カイコ*	0	80
コナガ**	40	80
ハスモンヨトウ	0	40

\*5日後に調査、 \*\*2日後に調査

【0038】

実施例6：バチルス・チューリングエンシス・セロバー・ガレリア (Bacillus thuringiensis serovar galleriae) SDS502株の殺虫活性蛋白質に關与する遺伝子

バチルス・チューリングエンシス・セロバー・ガレリア (Bacillus thuringiensis serovar galleriae) SDS502株の產生する約130kDaの結晶蛋白質をモルモットに免疫して得られた抗体を用い、SDS502株結晶蛋白質をコードする遺伝子 (以下SDS502遺伝子と略記) をクローニングした。得られた遺伝子は、3690塩基を有し、187番目のATGコドンから、3688番目のTAAコドンまでの翻訳領域を含む。更に、公知の鞘翅目昆虫に活性を示すヤポネンシ

スブイブイ (japonensis buibui) 遺伝子 (特開平6-65292号) 及びヤポネンシス N 1 4 1 (japonensis N141) 遺伝子 (特開平8-228783号) との比較の結果、両遺伝子は、アミノ酸配列でそれぞれ 7 1 %、4 2 % の相同性しか有していなかった。

【 0 0 3 9 】

実施例 7 : S D S 5 0 2 遺伝子の単離とそのクローニング

S D S 5 0 2 株から得られた全 DNA を調製し、制限酵素 E c o R I で部分的に切断した。切断した DNA より約 2 ~ 5 k b p の DNA 断片を分画し、E c o R I で切断したファージベクター ( $\lambda$ gt11) に連結し、これにより大腸菌を形質転換した。次に、組み換え大腸菌クローンを、S D S 5 0 2 株結晶蛋白質と考えられる約 1 3 0 k D a の蛋白質をモルモットに免疫して得られた抗体を用いて抗体スクリーニングすることにより、S D S 5 0 2 遺伝子を含有するクローンを確認した。この組み換え大腸菌クローンから DNA を調製し、制限酵素 E c o R I で切断した。切断 DNA 断片を 0 . 8 % アガロースゲルで電気泳動することにより約 3 . 4 k b p の挿入 DNA 断片を確認した。

得られた DNA 断片を分画し、E c o R I 切断したプラスミドベクターである Bluescript II SK ( - ) に連結し、遺伝子カセット ( p S D S 5 0 2 ) を作成した ( 図 3 ) 。 p S D S 5 0 2 は、完全長ではなかったため、再度クローニングを行った後、ダイデオキシ法により完全長の S D S 5 0 2 遺伝子を含有する DNA 断片の DNA 塩基配列を決定した。

【 0 0 4 0 】

実施例 8 : 大腸菌 ( E . c o l i : D H 5  $\alpha$  ) での S D S 5 0 2 結晶蛋白質の発現と発現蛋白の特性

S D S 5 0 2 遺伝子を用い結晶蛋白質を生産させるために、上記実施例で作製した遺伝子カセット ( p S D S 5 0 2 ) を用い大腸菌 ( E . c o l i : D H 5  $\alpha$  ) を形質転換し、組み換え大腸菌 ( 以下、E . c o l i : D H 5  $\alpha$  ( p S D S 5 0 2 ) と記載する。 ) を得た。該組み換え大腸菌を、L B - a m p 液体培地 ( T r y p t o n 1 0 g 、 N a C l 1 0 g 、酵母エキス ( Yeast extract ) 5 g 、グルコース ( Glucose ) 0 . 2 % 、アンピシリン ( Ampicillin ) 5 0 m g / 滅菌水 1 L ) を用い

て 3 7℃ で約 3 時間培養した後、終濃度 1 mM となるようにイソプロピル 1-チ  
 オ-β-D-ガラクトシド (IPTG) を添加し、さらに 3 7℃ で 2 0 時間培養  
 した。培養終了後、培養液を遠心分離し、沈殿に (Lysisbuffer) を 4 倍量 (W  
 /V) 添加し、室温で 1 0 分間懸濁し、次いでリゾチーム (Lysozyme) を終濃度  
 1 mg/mL になるよう添加し、混和後 1 0 分間氷上で静置した。さらに、Tr  
 iton X-1 0 0 を終濃度 1 % になるように添加し、混和後、室温で 1 0 分間  
 静置した。次いで遠心分離し、上清部分を回収した。得られた上清を 8 % SDS  
 -PAGE ゲル電気泳動にかけ泳動パターンを調べた。また抗体を用いてウエス  
 タンブロッティングもおこなった。その結果、E. coli : DH5 α (p SDS  
 S 5 0 2) が c r y SDS 5 0 2 結晶蛋白質を産生していることが確認された。

【0 0 4 1】

実施例 9 : E. coli : DH5 α (p SDS 5 0 2) 由来の結晶蛋白質のドウ  
 ガネブイブイ (Anomala cuprea) ならびに、マメコガネ (Popilliae japonica)  
 1 令幼虫に対する殺虫活性

得られた上清溶液を結晶蛋白質濃度が 1 0 μ g / m l となるように希釈し、  
 展着剤を添加して試料溶液とした。この試料溶液を予め滅菌処理しておいた腐葉  
 土に混和し、ドウガネブイブイ (Anomala cuprea) およびマメコガネ (Popillia  
 e japonica) 1 令を放虫した。その結果、ドウガネブイブイ (Anomala cuprea)  
 およびマメコガネ (Popilliae japonica) に対する殺虫活性が確認された。

【0 0 4 2】

【発明の効果】

本発明により、鞘翅目幼虫に対する高い殺虫性毒素蛋白質を産生する能力を有  
 する新規微生物バチルス・チューリングエンシス・セロバー・ガレリア (Bacillus  
 thuringiensis serovar galleriae) SDS 5 0 2 株を見出し、その殺虫性結晶  
 蛋白質をコードする遺伝子及び殺虫性結晶蛋白質を見出した。また該蛋白質を有  
 効成分として含有することを特徴とする有害生物防除剤を製剤化することで、従  
 来の B t 剤に抵抗性の生じた有害生物に対して活性を有する有害生物防除剤を供  
 給できた。特に本発明の有害生物防除剤は、シバ、サトイモ、サツマイモ、ラッ  
 カセイ等の大害虫であるドウガネブイブイの幼虫やシバ草害虫であるセマダラコ

ガネ、マメコガネなどの害虫に対し、従来の化学合成殺虫剤や亜種ヤポネンシスに属するブイブイ株等に比べ、効果、価格面でより有効なものとなる。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> SDS Biotech K.K.

<120> Protein Having Insecticidal Activity, DNA Coding Said Protein, Pest Control Agent and Pest Control Method

<130> BOP-3424

<160> 3

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1167

<212> PRT

<213> *Bacillus thuringiensis*

<400> 1

Met Ser Pro Asn Asn Gln Asn Glu Tyr Glu Ile Leu Asp Ala Ser Ser

1 5 10 15

Ser Thr Ser Val Ser Asp Asn Ser Val Arg Tyr Pro Leu Ala Asn Asp

20 25 30

Gln Thr Thr Thr Leu Gln Asn Met Asn Tyr Lys Asp Tyr Leu Arg Met

35 40 45



Ser Glu Gly Glu Asn Pro Glu Leu Phe Gly Asn Pro Glu Thr Phe Ile

50

55

60

Ser Ser Ser Thr Val Gln Thr Gly Ile Gly Ile Val Gly Gln Val Leu

65

70

75

80

Gly Ala Leu Gly Val Pro Phe Ala Gly Gln Ile Ala Ser Phe Tyr Ser

85

90

95

Phe Ile Val Gly Gln Leu Trp Pro Ser Ser Thr Val Ser Val Trp Glu

100

105

110

Met Ile Met Lys Gln Val Glu Asp Leu Ile Asp Gln Lys Ile Thr Asp

115

120

125

Ser Val Arg Lys Thr Ala Leu Ala Gly Leu Gln Gly Leu Gly Asp Gly

130

135

140

Leu Asp Val Tyr Gln Lys Ser Leu Lys Asn Trp Leu Glu Asn Arg Asn

145

150

155

160

Asp Thr Arg Ala Arg Ser Val Val Val Thr Gln Tyr Ile Ala Leu Glu

165

170

175

Leu Asp Phe Val Ala Lys Ile Pro Ser Phe Ala Ile Ser Gly Gln Glu

180

185

190

Val Pro Leu Leu Ser Val Tyr Ala Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Leu

195

200

205

Leu Leu Arg Asp Ala Ser Ile Phe Gly Ala Glu Trp Gly Phe Thr Pro

210

215

220

Gly Glu Ile Ser Thr Phe Tyr Asp Arg Gln Val Thr Arg Thr Ala Gln

225

230

235

240

Tyr Ser Asp Tyr Cys Val Lys Trp Tyr Asn Thr Gly Leu Asp Lys Leu

245

250

255

Lys Gly Thr Asn Ala Ala Ser Trp Leu Lys Tyr His Gln Phe Arg Arg

260

265

270

Glu Met Thr Leu Leu Val Leu Asp Leu Val Ala Leu Phe Pro Asn Tyr

275

280

285

Asp Thr Arg Thr Tyr Pro Ile Glu Thr Thr Ala Gln Leu Thr Arg Glu

290

295

300

Val Tyr Thr Asp Pro Ile Val Phe Asn Arg Glu Thr Ser Gly Gly Phe

305

310

315

320

Cys Arg Arg Trp Ser Leu Asn Ser Asp Ile Ser Phe Ser Glu Val Glu

325

330

335

Ser Ala Val Ile Arg Ser Pro His Leu Phe Asp Ile Leu Ser Glu Ile

340

345

350

Glu Phe Tyr Thr Thr Arg Ala Gly Leu Pro Leu Asn Asn Thr Glu Tyr  
355 360 365

Leu Glu Tyr Trp Val Gly His Ser Ile Lys Tyr Lys Asn Thr Asn Ala  
370 375 380

Ser Ser Ala Leu Glu Arg Asn Tyr Gly Thr Ile Thr Ser Asn Lys Ile  
385 390 395 400

Lys Tyr Tyr Asp Leu Ala Asn Lys Asp Ile Phe Gln Val Arg Ser Leu  
405 410 415

Gly Ala Asp Leu Ala Asn Tyr Tyr Ala Gln Val Tyr Gly Val Pro Tyr  
420 425 430

Ala Ser Phe Thr Leu Leu Asp Lys Asn Thr Gly Ser Gly Ser Val Gly  
435 440 445

Gly Phe Thr Tyr Ser Lys Pro His Thr Thr Met Gln Val Cys Thr Gln  
450 455 460

Asn Tyr Asn Thr Ile Asp Glu Ile Pro Pro Glu Asn Glu Pro Leu Ser  
465 470 475 480

Arg Gly Tyr Ser His Arg Leu Ser His Ile Thr Ser Tyr Ser Phe Ser  
485 490 495

Lys Asn Ala Ser Ser Pro Ala Arg Tyr Gly Asn Leu Pro Val Phe Ala  
500 505 510

Trp Thr His Arg Ser Ala Asp Val Thr Asn Thr Val Tyr Ser Asp Lys

515

520

525

Ile Thr Gln Ile Pro Val Val Lys Ala His Thr Leu Val Ser Gly Thr

530

535

540

Thr Val Ile Lys Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Asn Ile Leu Lys Arg

545

550

555

560

Thr Ser Ser Gly Pro Leu Ala Tyr Thr Ser Val Ser Val Lys Ser Pro

565

570

575

Leu Ser Gln Arg Tyr Arg Ala Arg Ile Arg Tyr Ala Ser Thr Thr Asn

580

585

590

Leu Arg Leu Phe Val Thr Ile Ser Gly Thr Arg Ile Tyr Ser Ile Asn

595

600

605

Val Asn Lys Thr Met Asn Lys Gly Asp Asp Leu Thr Phe Asn Thr Phe

610

615

620

Asp Leu Ala Thr Ile Gly Thr Ala Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Ser Asp

625

630

635

640

Ser Leu Thr Val Gly Ala Asp Ser Phe Ala Ser Gly Gly Glu Val Tyr

645

650

655

Val Asp Lys Phe Glu Leu Ile Pro Val Asn Ala Thr Phe Glu Ala Glu

660	665	670
Glu Asp Leu Asp Val Ala Lys Lys Ala Val Asn Gly Leu Phe Thr Ser		
675	680	685
Lys Lys Asp Ala Leu Gln Thr Ser Val Thr Asp Tyr Gln Val Asn Gln		
690	695	700
Ala Ala Asn Leu Val Glu Cys Leu Ser Asp Glu Leu Tyr Pro Asn Glu		
705	710	715
Lys Arg Met Leu Trp Asp Ala Val Lys Glu Ala Lys Arg Leu Val Gln		
725	730	735
Ala Arg Asn Leu Leu Gln Asp Thr Gly Phe Asn Arg Ile Asn Gly Glu		
740	745	750
Asn Gly Trp Thr Gly Ser Thr Gly Ile Glu Val Ala Glu Gly Asp Val		
755	760	765
Leu Phe Lys Asp Arg Ser Leu Arg Leu Thr Ser Ala Arg Glu Ile Asp		
770	775	780
Thr Glu Thr Tyr Pro Thr Tyr Leu Tyr Gln Gln Ile Asp Glu Ser Leu		
785	790	795
Leu Lys Pro Tyr Thr Arg Tyr Lys Leu Lys Gly Phe Ile Gly Ser Ser		
805	810	815

Gln Asp Leu Glu Ile Lys Leu Ile Arg His Arg Ala Asn Gln Ile Val  
820 825 830

Lys Asn Val Pro Asp Asn Leu Leu Pro Asp Val Leu Pro Val Asn Ser  
835 840 845

Cys Gly Gly Ile Asp Arg Cys Ser Glu Gln Gln Tyr Val Asp Ala Asn  
850 855 860

Leu Ala Leu Glu Asn Asn Gly Glu Asn Gly Asn Met Ser Ser Asp Ser  
865 870 875 880

His Ala Phe Ser Phe His Ile Asp Thr Gly Glu Ile Asp Leu Asn Glu  
885 890 895

Asn Thr Gly Ile Trp Val Val Phe Lys Ile Pro Thr Thr Asn Gly Tyr  
900 905 910

Ala Thr Leu Gly Asn Leu Glu Leu Val Glu Glu Gly Pro Leu Ser Gly  
915 920 925

Glu Thr Leu Glu Arg Ala Gln Gln Gln Glu Gln Gln Trp Gln Asp Lys  
930 935 940

Met Ala Arg Lys Arg Gly Ala Ser Glu Lys Ala Tyr Tyr Ala Ala Lys  
945 950 955 960

Gln Ala Ile Asp Arg Leu Phe Ala Asp Tyr Gln Asp Gln Lys Leu Asn  
965 970 975

Ser Gly Val Glu Met Ser Asp Met Leu Ala Ala Gln Asn Leu Val Gln

980

985

990

Ser Ile Pro Tyr Val Tyr Asn Asp Ala Leu Pro Glu Ile Pro Gly Met

995

1000

1005

Asn Tyr Thr Ser Phe Thr Glu Leu Thr Asn Arg Leu Gln Gln Ala Trp

1010

1015

1020

Asn Leu Tyr Asp Leu Arg Asn Ala Ile Pro Asn Gly Asp Phe Arg Asn

1025

1030

1035

1040

Gly Leu Ser Asp Trp Asn Ala Thr Ser Asp Val Asn Val Gln Gln Leu

1045

1050

1055

Ser Asp Thr Ser Val Leu Val Ile Pro Asn Trp Asn Ser Gln Val Ser

1060

1065

1070

Gln Gln Phe Thr Val Gln Pro Asn Tyr Arg Tyr Val Leu Arg Val Thr

1075

1080

1085

Ala Arg Lys Glu Gly Val Gly Asp Gly Tyr Val Ile Ile Arg Asp Gly

1090

1095

1100

Ala Asn Gln Thr Glu Thr Leu Thr Phe Asn Ile Cys Asp Asp Asp Thr

1105

1110

1115

1120

Gly Val Leu Ser Ala Asp Gln Thr Ser Tyr Ile Thr Lys Thr Val Glu

1125

1130

1135

Phe Thr Pro Ser Thr Glu Gln Val Trp Ile Asp Met Ser Glu Thr Glu

1140

1145

1150

Gly Val Phe Asn Ile Glu Ser Val Glu Leu Val Leu Glu Glu Glu

1155

1160

1165

<210> 2

<211> 3504

<212> DNA

<213> *Bacillus thuringiensis*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(3501)

<400> 2

atg agt cca aat aat caa aat gaa tat gaa att cta gat gct tca tca 48

Met Ser Pro Asn Asn Gln Asn Glu Tyr Glu Ile Leu Asp Ala Ser Ser

1

5

10

15

tct act tct gta tcc gat aat tct gtt aga tac cct tta gca aac gat 96

Ser Thr Ser Val Ser Asp Asn Ser Val Arg Tyr Pro Leu Ala Asn Asp

20

25

30



caa acg acc aca tta caa aac atg aac tat aaa gat tat ctg aga atg 144

Gln Thr Thr Thr Leu Gln Asn Met Asn Tyr Lys Asp Tyr Leu Arg Met

35

40

45

tct gag gga gag aat cct gaa tta ttt gga aat ccg gag acg ttt att 192

Ser Glu Gly Glu Asn Pro Glu Leu Phe Gly Asn Pro Glu Thr Phe Ile

50

55

60

agt tca tct acg gtt caa act gga att ggc att gtt ggt caa gta ctg 240

Ser Ser Ser Thr Val Gln Thr Gly Ile Gly Ile Val Gly Gln Val Leu

65

70

75

80

ggg gct tta ggg gtt cca ttt gct gga cag ata gct agt ttt tat agt 288

Gly Ala Leu Gly Val Pro Phe Ala Gly Gln Ile Ala Ser Phe Tyr Ser

85

90

95

ttc att gtc ggt caa tta tgg cca tca agt acc gtg agt gta tgg gaa 336

Phe Ile Val Gly Gln Leu Trp Pro Ser Ser Thr Val Ser Val Trp Glu

100

105

110

atg att atg aaa caa gtg gaa gat cta att gat caa aaa ata aca gat 384

Met Ile Met Lys Gln Val Glu Asp Leu Ile Asp Gln Lys Ile Thr Asp

115

120

125

tct gta agg aaa aca gcg ctt gca gga cta caa gga tta gga gat ggc 432

Ser Val Arg Lys Thr Ala Leu Ala Gly Leu Gln Gly Leu Gly Asp Gly

130

135

140

tta gac gta tat cag aaa tca ctt aag aat tgg ctg gaa aat cgt aat 480

Leu Asp Val Tyr Gln Lys Ser Leu Lys Asn Trp Leu Glu Asn Arg Asn  
145 150 155 160

gat aca aga gct aga agt gtt gtg gtg acc caa tat ata gct tta gag 528  
Asp Thr Arg Ala Arg Ser Val Val Val Thr Gln Tyr Ile Ala Leu Glu  
165 170 175

ctt gat ttt gtt gct aaa atc cca tct ttt gca ata tct gga cag gaa 576  
Leu Asp Phe Val Ala Lys Ile Pro Ser Phe Ala Ile Ser Gly Gln Glu  
180 185 190

gta cca tta tta tca gtg tat gca caa gca gcg aat tta cat ttg cta 624  
Val Pro Leu Leu Ser Val Tyr Ala Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Leu  
195 200 205

tta tta cga gat gct tcc att ttt gga gca gag tgg gga ttc aca cca 672  
Leu Leu Arg Asp Ala Ser Ile Phe Gly Ala Glu Trp Gly Phe Thr Pro  
210 215 220

gga gaa att tcc aca ttt tat gat cgt cag gtg aca cgt acc gcc caa 720  
Gly Glu Ile Ser Thr Phe Tyr Asp Arg Gln Val Thr Arg Thr Ala Gln  
225 230 235 240

tac tcg gat tat tgt gta aag tgg tat aac act ggc tta gat aaa tta 768  
Tyr Ser Asp Tyr Cys Val Lys Trp Tyr Asn Thr Gly Leu Asp Lys Leu  
245 250 255

aaa ggt acg aat gct gca agt tgg ctg aag tat cac caa ttc cga aga 816  
Lys Gly Thr Asn Ala Ala Ser Trp Leu Lys Tyr His Gln Phe Arg Arg

260	265	270	
gaa atg aca tta ctg gta tta gat tta gta gcg tta ttt cca aac tat			864
Glu Met Thr Leu Leu Val Leu Asp Leu Val Ala Leu Phe Pro Asn Tyr			
275	280	285	
gac aca cgt acg tat cca atc gaa aca acg gcc caa ctt aca cgg gaa			912
Asp Thr Arg Thr Tyr Pro Ile Glu Thr Thr Ala Gln Leu Thr Arg Glu			
290	295	300	
gtg tat aca gat cca ata gta ttt aac aga gaa aca agt ggt gga ttt			960
Val Tyr Thr Asp Pro Ile Val Phe Asn Arg Glu Thr Ser Gly Gly Phe			
305	310	315	320
tgt agg cgt tgg tca ctt aac agt gat att tct ttt tca gaa gtc gaa			1008
Cys Arg Arg Trp Ser Leu Asn Ser Asp Ile Ser Phe Ser Glu Val Glu			
325	330	335	
agc gct gta att cgt tca cca cac cta ttt gat ata ctc agt gaa ata			1056
Ser Ala Val Ile Arg Ser Pro His Leu Phe Asp Ile Leu Ser Glu Ile			
340	345	350	
gaa ttt tat aca aca aga gcg ggg ctt ccc ttg aat aat acg gaa tac			1104
Glu Phe Tyr Thr Thr Arg Ala Gly Leu Pro Leu Asn Asn Thr Glu Tyr			
355	360	365	
ctt gaa tat tgg gta gga cat tct ata aaa tat aaa aat acg aat gcc			1152
Leu Glu Tyr Trp Val Gly His Ser Ile Lys Tyr Lys Asn Thr Asn Ala			
370	375	380	

tca tca gca tta gaa cgt aat tac ggt acg att act tct aac aaa atc 1200  
 Ser Ser Ala Leu Glu Arg Asn Tyr Gly Thr Ile Thr Ser Asn Lys Ile  
 385 390 395 400

aag tat tat gat tta gca aat aag gat atc ttt cag gtt cga tca tta 1248  
 Lys Tyr Tyr Asp Leu Ala Asn Lys Asp Ile Phe Gln Val Arg Ser Leu  
 405 410 415

ggg gcg gat tta gct aat tac tac gca cag gta tat gga gtt ccg tac 1296  
 Gly Ala Asp Leu Ala Asn Tyr Tyr Ala Gln Val Tyr Gly Val Pro Tyr  
 420 425 430

gct agt ttt aca ctg ctt gac aag aat aca gga tca gga tca gtt gga 1344  
 Ala Ser Phe Thr Leu Leu Asp Lys Asn Thr Gly Ser Gly Ser Val Gly  
 435 440 445

ggt ttt acg tac tca aaa cca cat aca act atg caa gta tgt aca caa 1392  
 Gly Phe Thr Tyr Ser Lys Pro His Thr Thr Met Gln Val Cys Thr Gln  
 450 455 460

aat tac aat acg att gat gaa atc cct cca gag aat gag cca ctt agt 1440  
 Asn Tyr Asn Thr Ile Asp Glu Ile Pro Pro Glu Asn Glu Pro Leu Ser  
 465 470 475 480

aga ggg tat agc cat aga tta tct cat atc acc tct tat tct ttt tct 1488  
 Arg Gly Tyr Ser His Arg Leu Ser His Ile Thr Ser Tyr Ser Phe Ser  
 485 490 495

aag aat gct agt agt cct gct aga tat ggc aat ctc cct gta ttt gct 1536

Lys Asn Ala Ser Ser Pro Ala Arg Tyr Gly Asn Leu Pro Val Phe Ala

500

505

510

tgg aca cat cgg agt gcg gat gtt aca aat aca gtt tat tca gat aaa 1584

Trp Thr His Arg Ser Ala Asp Val Thr Asn Thr Val Tyr Ser Asp Lys

515

520

525

att act cag ata cca gtt gta aag gca cat act tta gtt tca ggt act 1632

Ile Thr Gln Ile Pro Val Val Lys Ala His Thr Leu Val Ser Gly Thr

530

535

540

act gtt att aaa ggt cct gga ttt aca gga ggc aat atc ctt aaa aga 1680

Thr Val Ile Lys Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Asn Ile Leu Lys Arg

545

550

555

560

aca agt agt ggt ccg tta gct tat act agt gtc tct gta aaa tca cca 1728

Thr Ser Ser Gly Pro Leu Ala Tyr Thr Ser Val Ser Val Lys Ser Pro

565

570

575

tta tca caa aga tat cgt gca aga ata cgt tat gct tct act act aac 1776

Leu Ser Gln Arg Tyr Arg Ala Arg Ile Arg Tyr Ala Ser Thr Thr Asn

580

585

590

tta cga ctt ttt gta aca att tct gga act cgc att tac tct ata aat 1824

Leu Arg Leu Phe Val Thr Ile Ser Gly Thr Arg Ile Tyr Ser Ile Asn

595

600

605

gtt aat aaa acc atg aat aaa ggg gat gat tta aca ttt aat aca ttt 1872

Val Asn Lys Thr Met Asn Lys Gly Asp Asp Leu Thr Phe Asn Thr Phe  
 610 615 620

gac tta gca act att ggt act gct ttc aca ttt tca aat tac tcg gat 1920  
 Asp Leu Ala Thr Ile Gly Thr Ala Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Ser Asp  
 625 630 635 640

agc tta acg gta ggt gca gat tct ttt gct tca gga gga gaa gtt tat 1968  
 Ser Leu Thr Val Gly Ala Asp Ser Phe Ala Ser Gly Gly Glu Val Tyr  
 645 650 655

gta gat aag ttc gaa ctt att ccg gta aat gca aca ttt gaa gca gaa 2016  
 Val Asp Lys Phe Glu Leu Ile Pro Val Asn Ala Thr Phe Glu Ala Glu  
 660 665 670

gaa gac cta gat gtg gca aag aaa gca gta aat ggc ttg ttt acg agt 2064  
 Glu Asp Leu Asp Val Ala Lys Lys Ala Val Asn Gly Leu Phe Thr Ser  
 675 680 685

aaa aaa gat gcc tta cag aca agt gta acg gat tat caa gtg aat caa 2112  
 Lys Lys Asp Ala Leu Gln Thr Ser Val Thr Asp Tyr Gln Val Asn Gln  
 690 695 700

gcg gca aac tta gta gaa tgc cta tcc gat gag tta tac cca aat gaa 2160  
 Ala Ala Asn Leu Val Glu Cys Leu Ser Asp Glu Leu Tyr Pro Asn Glu  
 705 710 715 720

aaa cga atg tta tgg gat gca gtg aaa gag gcg aaa cga ctt gtt cag 2208  
 Lys Arg Met Leu Trp Asp Ala Val Lys Glu Ala Lys Arg Leu Val Gln

725	730	735	
gca cgt aac tta ctc caa gat aca ggc ttt aat agg att aat gga gaa			2256
Ala Arg Asn Leu Leu Gln Asp Thr Gly Phe Asn Arg Ile Asn Gly Glu			
740	745	750	
aac gga tgg acg gga agt acg gga atc gag gtt gcg gaa gga gat gtt			2304
Asn Gly Trp Thr Gly Ser Thr Gly Ile Glu Val Ala Glu Gly Asp Val			
755	760	765	
ctg ttt aaa gat cgt tcg ctt cgt ttg aca agt gcg aga gag att gat			2352
Leu Phe Lys Asp Arg Ser Leu Arg Leu Thr Ser Ala Arg Glu Ile Asp			
770	775	780	
aca gaa aca tat cca acg tat ctc tat caa caa ata gat gaa tca ctt			2400
Thr Glu Thr Tyr Pro Thr Tyr Leu Tyr Gln Gln Ile Asp Glu Ser Leu			
785	790	795	800
tta aaa cca tat aca aga tat aaa cta aaa ggt ttt ata gga agt agt			2448
Leu Lys Pro Tyr Thr Arg Tyr Lys Leu Lys Gly Phe Ile Gly Ser Ser			
805	810	815	
caa gat tta gag att aaa tta ata cgt cat cgg gca aat caa atc gtc			2496
Gln Asp Leu Glu Ile Lys Leu Ile Arg His Arg Ala Asn Gln Ile Val			
820	825	830	
aaa aat gta cca gat aat ctc ttg cca gat gta ctc cct gtc aat tct			2544
Lys Asn Val Pro Asp Asn Leu Leu Pro Asp Val Leu Pro Val Asn Ser			
835	840	845	

tgt ggt ggg atc gat cgc tgc agt gag caa cag tat gta gac gcg aat 2592

Cys Gly Gly Ile Asp Arg Cys Ser Glu Gln Gln Tyr Val Asp Ala Asn

850

855

860

tta gca ctc gaa aac aat gga gaa aat gga aat atg tct tct gat tcc 2640

Leu Ala Leu Glu Asn Asn Gly Glu Asn Gly Asn Met Ser Ser Asp Ser

865

870

875

880

cat gca ttt tct ttc cat att gat aca ggt gaa ata gat ttg aat gaa 2688

His Ala Phe Ser Phe His Ile Asp Thr Gly Glu Ile Asp Leu Asn Glu

885

890

895

aat aca gga att tgg gtc gta ttt aaa att ccg aca aca aat gga tac 2736

Asn Thr Gly Ile Trp Val Val Phe Lys Ile Pro Thr Thr Asn Gly Tyr

900

905

910

gca aca cta gga aat ctt gaa ttg gta gaa gag ggg cca ttg tca ggg 2784

Ala Thr Leu Gly Asn Leu Glu Leu Val Glu Glu Gly Pro Leu Ser Gly

915

920

925

gaa aca tta gaa cga gca caa caa caa gaa caa caa tgg caa gac aaa 2832

Glu Thr Leu Glu Arg Ala Gln Gln Gln Glu Gln Gln Trp Gln Asp Lys

930

935

940

atg gca aga aaa cgt ggg gca tca gaa aaa gca tat tat gca gca aag 2880

Met Ala Arg Lys Arg Gly Ala Ser Glu Lys Ala Tyr Tyr Ala Ala Lys

945

950

955

960



caa gcc att gat cgt tta ttc gca gat tat caa gac caa aaa ctt aat 2928  
Gln Ala Ile Asp Arg Leu Phe Ala Asp Tyr Gln Asp Gln Lys Leu Asn

965

970

975

tct ggt gta gaa atg tca gat atg ttg gca gcc caa aac ctt gta cag 2976  
Ser Gly Val Glu Met Ser Asp Met Leu Ala Ala Gln Asn Leu Val Gln

980

985

990

tcc att cct tac gta tat aat gat gcg tta cca gaa atc cct gga atg 3024  
Ser Ile Pro Tyr Val Tyr Asn Asp Ala Leu Pro Glu Ile Pro Gly Met

995

1000

1005

aac tat acg agt ttt aca gag tta aca aat aga ctc caa caa gca tgg 3072  
Asn Tyr Thr Ser Phe Thr Glu Leu Thr Asn Arg Leu Gln Gln Ala Trp

1010

1015

1020

aat ttg tat gat ctt cga aat gct ata cca aat gga gat ttt cga aat 3120  
Asn Leu Tyr Asp Leu Arg Asn Ala Ile Pro Asn Gly Asp Phe Arg Asn

1025

1030

1035

1040

gga tta agt gat tgg aat gca aca tca gat gtg aat gtg caa caa cta 3168  
Gly Leu Ser Asp Trp Asn Ala Thr Ser Asp Val Asn Val Gln Gln Leu

1045

1050

1055

agc gat aca tct gtc ctt gtc att cca aac tgg aat tct caa gtg tca 3216  
Ser Asp Thr Ser Val Leu Val Ile Pro Asn Trp Asn Ser Gln Val Ser

1060

1065

1070

caa caa ttt aca gtt caa ccg aat tat aga tat gtg tta cgt gtc aca 3264

Gln Gln Phe Thr Val Gln Pro Asn Tyr Arg Tyr Val Leu Arg Val Thr

1075

1080

1085

gcg aga aaa gag gga gta gga gac gga tat gtg atc atc cgt gat ggt 3312

Ala Arg Lys Glu Gly Val Gly Asp Gly Tyr Val Ile Ile Arg Asp Gly

1090

1095

1100

gcg aat cag aca gaa aca ctc aca ttt aat ata tgt gat gat gat aca 3360

Ala Asn Gln Thr Glu Thr Leu Thr Phe Asn Ile Cys Asp Asp Asp Thr

1105

1110

1115

1120

ggt gtt tta tct gct gat caa act agc tat atc aca aaa aca gtg gaa 3408

Gly Val Leu Ser Ala Asp Gln Thr Ser Tyr Ile Thr Lys Thr Val Glu

1125

1130

1135

ttc act cca tct aca gag caa gtt tgg att gac atg agt gag acc gaa 3456

Phe Thr Pro Ser Thr Glu Gln Val Trp Ile Asp Met Ser Glu Thr Glu

1140

1145

1150

ggt gta ttc aac ata gaa agt gta gaa ctc gtg tta gaa gaa gag taa 3504

Gly Val Phe Asn Ile Glu Ser Val Glu Leu Val Leu Glu Glu Glu

1155

1160

1165

<210> 3

<211> 3690

<212> DNA

<213> *Bacillus thuringiensis*

## &lt;400&gt; 3

gaattctaata gacacagtag aatattttta aaataaagat ggaagggggg atatgaaaaa 60  
 tataatcaca agagtcatac aaaaagatgg ttatgttaaa acaaaaaaat cctgtaggaa 120  
 taagggttta aaagcaatcg tttgaaaaga tagttatatt aaattgtatg tataggggga 180  
 aaaaagatga gtccaaataa tcaaaatgaa tatgaaattc tagatgcttc atcatctact 240  
 tctgtatccg ataattctgt tagataccct ttagcaaacg atcaaacgac cacattacaa 300  
 aacatgaact ataaagatta tctgagaatg tctgaggag agaatcctga attatttgga 360  
 aatccggaga cgtttattag ttcattctacg gttcaaactg gaattggcat tgttggtcaa 420  
 gtactggggg ctttaggggt tccatttgct ggacagatag ctagttttta tagtttcatt 480  
 gtcggtcaat tatggccatc aagtaccgtg agtgtatggg aaatgattat gaaacaagtg 540  
 gaagatctaa ttgatcaaaa aataacagat tctgtaagga aaacagcgct tgcaggacta 600  
 caaggattag gagatggctt agacgtatat cagaaatcac ttaagaattg gctggaaaat 660  
 cgtaatgata caagagctag aagtgttggt gtgaccaat atatagcttt agagcttgat 720  
 tttgttgcta aaatcccatc ttttgcaata tctggacagg aagtaccatt attatcagt 780  
 tatgcacaag cagcgaattt acatttgcta ttattacgag atgcttccat ttttgagca 840  
 gagtggggat tcacaccagg agaaatttcc acattttatg atcgtcagg gacacgtacc 900  
 gcccaatact cggattattg tgtaaagtgg tataacactg gcttagataa attaaaaggt 960  
 acgaatgctg caagttggct gaagtatcac caattccgaa gagaaatgac attactggta 1020  
 ttagatttag tagcggttatt tccaaactat gacacacgta cgtatccaat cgaaacaacg 1080  
 gcccaactta cacgggaagt gtatacagat ccaatagtat ttaacagaga aacaagtgg 1140  
 ggattttgta ggcgttggtc acttaacagt gatatttctt tttcagaagt cgaaagcgct 1200  
 gtaattcggt caccacacct atttgatata ctcagtgaag tagaatttta tacaacaaga 1260  
 gcggggcttc ccttgaataa tacggaatac cttgaatatt gggtaggaca ttctataaaa 1320  
 tataaaaaata cgaatgcctc atcagcatta gaacgtaatt acggtacgat tacttctaac 1380  
 aaaatcaagt attatgattt agcaaataag gatattcttc aggttcgatc attaggggag 1440  
 gatttagcta attactacgc acaggtatat ggagttccgt acgctagttt tacactgctt 1500  
 gacaagaata caggatcagg atcagttgga ggttttacgt actcaaaacc acatacaact 1560

atgcaagtat gtacacaaaa ttacaatacg attgatgaaa tccctccaga gaatgagcca 1620  
 cttagtagag ggtatagcca tagattatct catatcacct cttattcttt ttctaagaat 1680  
 gctagtagtc ctgctagata tggcaatctc cctgtatttg cttggacaca tcggagtgcg 1740  
 gatgttacia atacagttta ttcagataaa attactcaga taccagttgt aaaggcacat 1800  
 actttagttt caggtactac tgttattaaa ggtcctggat ttacaggagg caatatcctt 1860  
 aaaagaacaa gtagtggicc gttagcttat actagtgtct ctgtaaaatc accattatca 1920  
 caaagatata gtgcaagaat acgttatgct tctactacta acttacgact ttttgtaaca 1980  
 atttctggaa ctgcatttta ctctataaat gttaataaaa ccatgaataa aggggatgat 2040  
 ttaacattta atacatttga cttagcaact attggtactg ctttcacatt ttcaaattac 2100  
 tcggatagct taacggtagg tgcagattct tttgcttcag gaggagaagt ttatgtagat 2160  
 aagttcgaac ttattccggt aaatgcaaca tttgaagcag aagaagacct agatgtggca 2220  
 aagaaagcag taaatggctt gtttacgagt aaaaaagatg ccttacagac aagtgtaacg 2280  
 gattatcaag tgaatcaagc ggcaaactta gtagaatgcc tatccgatga gttataccca 2340  
 aatgaaaaac gaatgttatg ggatgcagtg aaagaggcga aacgacttgt tcaggcacgt 2400  
 aacttactcc aagatacagg ctttaatagg attaatggag aaaacggatg gacgggaagt 2460  
 acgggaatcg aggttgcgga aggagatgtt ctgtttaaag atcgttcgct tcgtttgaca 2520  
 agtgcgagag agattgatac agaaacatat ccaacgtatc tctatcaaca aatagatgaa 2580  
 tcacttttaa aaccatatac aagatataaa ctaaaagggt ttataggaag tagtcaagat 2640  
 ttagagatta aattaatacg tcatcgggca aatcaaactg tcaaaaatgt accagataat 2700  
 ctcttgccag atgtactccc tgtcaattct tgtggtggga tcgatcgctg cagttagcaa 2760  
 cagtatgtag acgcgaattt agcactcgaa aacaatggag aaaatggaaa tatgtcttct 2820  
 gattcccatg cattttcttt ccatattgat acaggtgaaa tagatttgaa tgaaaataca 2880  
 ggaatttggg tcgtatttaa aattccgaca acaaatggat acgcaacact aggaaatctt 2940  
 gaattggtag aagagggggc attgtcaggg gaaacattag aacgagcaca acaacaagaa 3000  
 caacaatggc aagacaaaat ggcaagaaaa cgtggggcat cagaaaaagc atattatgca 3060  
 gcaaagcaag ccattgatcg tttattcgca gattatcaag accaaaaact taattctggt 3120  
 gtagaaatgt cagatatgtt ggcagcccaa aacctgtac agtccattcc ttacgtatat 3180  
 aatgatgcgt taccagaaat ccctggaatg aactatacga gttttacaga gttacaaaat 3240  
 agactccaac aagcatggaa tttgtatgat cttcgaaatg ctataccaaa tggagatttt 3300

cgaaatggat taagtgattg gaatgcaaca tcagatgtga atgtgcaaca actaagcgat 3360  
acatctgtcc ttgtcattcc aaactggaat tctcaagtgt cacaacaatt tacagttcaa 3420  
ccgaattata gatatgtgtt acgtgtcaca gcgagaaaag agggagtagg agacggatat 3480  
gtgatcatcc gtgatggtgc gaatcagaca gaaacactca catttaatat atgtgatgat 3540  
gatacaggtg ttttatctgc tgatcaaact agctatatca caaaaacagt ggaattcact 3600  
ccatctacag agcaagtttg gattgacatg agtgagaccg aaggtgtatt caacatagaa 3660  
agtgtagaac tcgtgttaga agaagagtaa 3690

【図面の簡単な説明】

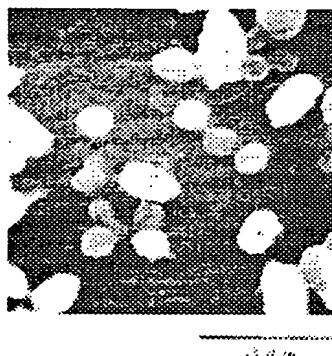
【図 1】 バチルス・チューリンゲンシス・セロバー・ガレリア S D S 5 0 2 株電子顕微鏡写真である。

【図 2】 本発明の殺虫活性を有する結晶蛋白質の S D S - P A G E 結果を示す図である。1 はマーカであり、上から 200、116.25、97.4、66.2、45.0 k D a を示す。2 は大腸菌で発現させた c r y S D S 5 0 2 遺伝子産物の結果であり、3 は S D S 5 0 2 結晶蛋白質の結果である。

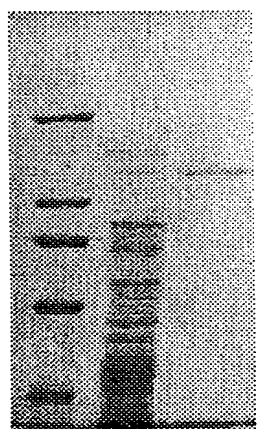
【図 3】 バチルス・チューリンゲンシス・セロバー・ガレリア (Bacillus thuringiensis serovar galleriae) S D S 5 0 2 遺伝子とベクターの連結図 (遺伝子カセット) である。

【書類名】 図面

【図 1】

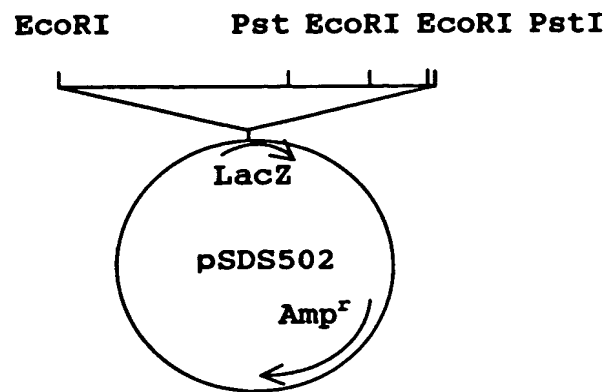


【図 2】



1	2	3
---	---	---

【図 3】





【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 従来の B t 剤に抵抗性を生じた害虫に対して効果があり、かつこれまで数種類しか報告されていない鞘翅目害虫にたいして活性を有する有害生物防除剤および該防除剤を用いた有害生物防除方法を提供する。

【解決手段】 有害生物防除剤の有効成分となる殺虫活性を有する蛋白質を産生する新規微生物バシルス・チューリングス・セロバー・ガレリア (Bacillus thuringiensis serovar galleriae) S D S 5 0 2 株、その株の産生する殺虫活性を有する蛋白質及びその蛋白質を構成するアミノ酸配列の複数のアミノ酸が付加、欠失または置換された配列を有し、同様の殺虫活性を示す蛋白質、それら殺虫活性を有する蛋白質をコードする DNA、その DNA を用いて形質転換された微生物、その DNA を用いて形質転換された植物及びその種子、並びに有害生物防除剤及び防除方法。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2000-236140
受付番号	50000990224
書類名	特許願
担当官	中村 仁美 4128
作成日	平成12年 8月 8日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】	000127879
【住所又は居所】	東京都港区芝2丁目5番6号
【氏名又は名称】	株式会社エス・ディー・エス バイオテック

【代理人】

申請人

【識別番号】	100081086
【住所又は居所】	東京都中央区日本橋人形町2丁目2番6号 堀口 第2ビル7階 大家特許事務所
【氏名又は名称】	大家 邦久

【代理人】

【識別番号】	100088719
【住所又は居所】	東京都中央区日本橋人形町2丁目2番6号 堀口 第2ビル7階 大家特許事務所
【氏名又は名称】	千葉 博史

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000127879]

1. 変更年月日 1998年10月20日

[変更理由] 住所変更

住 所 東京都港区芝2丁目5番6号

氏 名 株式会社エス・ディー・エス バイオテック